

BEST AVAILABLE COPY

PCT/CN2004/000842

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

REC'D 15 SEP 2004
WIPO PCT

申 请 日： 2003. 07. 22

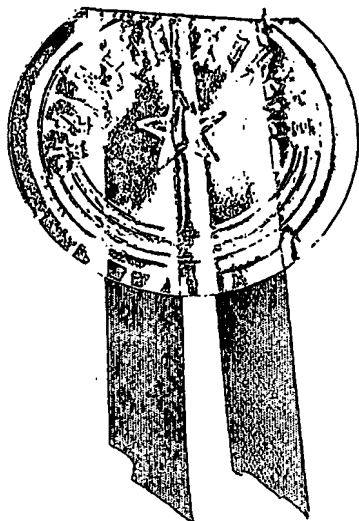
申 请 号： 03150240. 7

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 具有抑制血管生成及抗肿瘤作用的强化融合蛋白F v -
L D P - A E

申 请 人： 中国医学科学院医药生物技术研究所

发明人或设计人： 李亮、甄永苏、苗庆芳、尚伯杨、刘秀均、江敏



**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

中华人民共和国
国家知识产权局局长

王 荣 川

2004 年 7 月 28 日

权利要求书

1. 一种强化融合蛋白 Fv-LDP-AE, 其特征在于它是由抗明胶酶单链抗体 scFv、力达霉素辅基蛋白 LDP 和羧基端的组氨酸六聚体尾形成的融合蛋白 Fv-LDP(分子量约为 38.7kDa)以及活化型烯二炔发色团 AE(分子量为 843kDa)构成的, 基因全长 1119 bp, 编码 372 个氨基酸。
2. 如权利要求 1 所述的强化融合蛋白 Fv-LDP-AE, 其特征在于其中的 scFv 基因全长 738 bp, 编码 246 个氨基酸; LDP 基因全长 345 bp, 编码 115 个氨基酸; 二者之间的柔性肽基因 15 bp, 编码 5 个氨基酸; 羧基端的组氨酸六聚体尾基因为 18 bp 编码 6 个氨基酸; 终止密码子为 3 bp。
3. 强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 的制备方法, 其特征在于所说方法主要采用 DNA 重组和分子强化两条技术路线, 具体步骤如下:
 - A. 力达霉素辅基蛋白 LDP 与抗明胶酶单链抗体 scFv 的融合基因构建;
 - B. 融合蛋白大肠杆菌重组表达质粒 pEFL 的构建;
 - C. 融合蛋白 Fv-LDP 在大肠杆菌 CAMS/FLDFP (保藏编号: CGMCC No. 0960) 中的诱导表达;
 - D. 融合蛋白 Fv-LDP 的亲合层析纯化及分离;
 - E. 强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 的制备分离。
4. 如权利要求 3 所述的制备方法, 其特征是运用基因工程技术分别克隆得到力达霉素辅基蛋白 LDP 基因和抗基质金属蛋白酶 MMP-2/9 单链抗体 scFv 基因, 将二者以编码一段柔性小肽的 DNA 序列相连构建成 scFv-spacer-LDP 形式的融合基因, 同时在 spacer 区引入特异性酶切位点。
5. 如权利要求 3 或 4 所述的制备方法, 其特征是将所得到的融合基因克隆至大肠杆菌表达质粒 pET-30a (+) 中, 构建重组表达质粒 pEFL。
6. 如权利要求 3 或 5 所述的制备方法, 其特征是将 pEFL 转化入大肠杆菌宿主菌中, 经 IPTG 诱导表达获得包涵体形式的融合蛋白 Fv-LDP, 并进行条件优化获得最佳表达。
7. 如权利要求 3 或 6 所述的制备方法, 其特征是通过亲和层析纯化融合蛋白

Fv-LDP，再进行透析复性，浓缩冻干，制备功能性融合蛋白。

8. 如权利要求 3 或 7 所述的制备方法，其特征是将纯化分离得到的融合蛋白 Fv-LDP 与经甲醇提取制备的力达霉素发色团的活性型烯二炔 AE，按一定分子比和时间进行分子强化，获得强化融合蛋白 Fv-LDP-AE。
9. 强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 在制备抑制血管生成和抗肿瘤新型抗体导向药物中的应用。

说明书

具有抑制血管生成及抗肿瘤作用的强化融合蛋白 Fv-LDP-AE

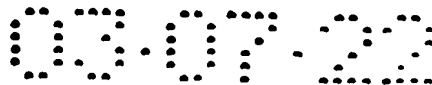
技术领域：

本发明涉及一种具有抑制血管生成作用、强烈杀伤肿瘤细胞活性和抗肿瘤治疗效果的新型抗体导向药物。

背景技术：

基质金属蛋白酶在癌细胞侵袭转移进程中扮演着重要角色，尤其明胶酶 MMP-2 和 MMP-9 可降解 IV 型胶原等细胞外基质组分，破坏基底膜及细胞外基质的完整性，有助于肿瘤细胞的侵袭与转移，在肿瘤新生血管内皮细胞的表达量高于正常组织血管内皮细胞。抑制基质金属蛋白酶的活性可以抑制肿瘤细胞的侵袭转移和肿瘤血管生成。因此，以基质金属蛋白酶 MMP-2/MMP-9 单抗做为导向药物的载体不仅可以提供肿瘤的靶向性，而其本身就具有抗肿瘤效应。本发明所涉及的抗 MMP-2/MMP-9 单抗 3G11 对多种肿瘤细胞均呈免疫学阳性反应，并与多种人体肿瘤组织尤其消化道肿瘤组织有特异性结合能力。单链抗体 (scFv) 通常是用一段柔性肽链将 V_H 和 V_L 连接构成的具有完整抗原结合位点的最小抗体功能片段。scFv 较 Fv 片段更稳定，并且 scFv 分子较完整抗体对实体瘤的渗透能力强，因而更适于作为单抗导向药物的载体。

高活性的“弹头”药物力达霉素 (LDM)，亦称 C-1027 或 C1027，是从我国湖北省潜江县土壤中分离得到的由一株球孢链霉菌 (*Streptomyces globisporus*，菌种保藏号为：CGMCC No. 0704) 产生的烯二炔类抗生素，是迄今报道过的对肿瘤细胞杀伤作用最强的大分子肽类抗肿瘤抗生素。体内动物实验表明，LDM 对小鼠结肠癌 26 有非常显著的疗效，对移植于裸鼠的人肝癌 Bel-7402 和盲肠癌 Hce-8693 等多种人体移植肿瘤均有显著疗效 (中国抗生素杂志 1994, 19<2>: 164-168)。LDM 的分子由两部分组成：其一为烯二炔结构的发色团，具有细胞毒作用，但不稳定；其二为 110 个氨基酸残基组成的辅基蛋白 (LDP)，对发色团的稳定性起保护作用。LDM 分子中的发色团以两种形式存在：活性型发色团 (即活性型烯二炔活性形式 active enediyne, AE) 和失活型发色团 (inactivated chromophore)，前者易于经过芳构化变为后者。LDM 分子中 AE 含量的高低决定其作用的强度。由于 LDM 分子中的发色团由活性型向失活型的转化，为使



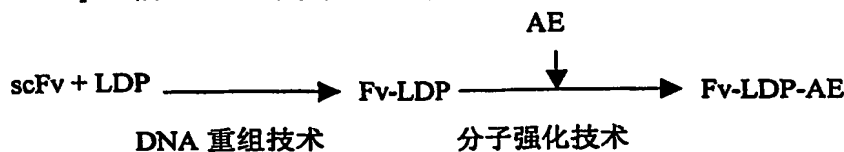
LDM 具有高强度的生物活性，必须保持高含量的 AE。发色团与辅基蛋白通过非共价键结合，两者的结合具有特异性和牢固性。LDM 可以拆分和进行分子强化，并以其独特的分子结构可以成为构建新型单抗导向药物的理想的“弹头”药物(中国医学科学院学报 2001, 23<6>: 563-567)。

单抗靶向药物的小型化、高效化以及寻找新的特异性肿瘤靶标是解决当前单抗治疗剂存在问题的主要有效途径。运用基因工程技术构建获得的单链抗体 scFv 与力达霉素制备的免疫导向融合蛋白能够有效地将效应分子导向特异性肿瘤靶部位, 较用化学偶联技术获得的免疫偶联物更具有分子均一性及高效小型化等优点。本实验室以往制备了组装型融合蛋白 LDM-Fv (药学学报 2000, 35<7>: 488-491), 但由于当时使用的发色团来源于一般的 LDM, 未能获得具有更强杀伤肿瘤细胞活性的融合蛋白, 未能观察到对血管生成的抑制作用, 亦未能在动物实验证明其疗效。研究证明, 强化融合蛋白对肿瘤细胞显示强烈的杀伤活性, 有高度的抑制血管生成作用, 动物实验有非常显著的治疗效果。经检索, 迄今国内外尚未见有类似的强化融合蛋白的有关报道。

本发明的目的是在构建新的融合蛋白 Fv-LDP 的基础上, 严格控制所用发色团的质量, 使用具有极强活性的活化型烯二炔 (AE) 进行分子强化, 以制备强化型融合蛋白 Fv-LDP-AE, 作为抗肿瘤效果更佳的新型抗体导向药物。

发明内容:

本发明所说的强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 是由抗明胶酶单链抗体 scFv、力达霉素辅基蛋白 LDP 和羧基端的组胺酸六聚体尾形成的融合蛋白 Fv-LDP (分子量约为 38.7kDa) 以及活化型烯二炔发色团 AE (分子量为 843 kDa) 构成的, 基因全长 1119bp, 编码 372 个氨基酸, 其制备技术路线为:



本发明采用 DNA 重组与分子强化等技术路线构建的强化融合蛋白 Fv-LDP-AE, 集中体现了小型化、高效化以及免疫原性较低的特点。该融合蛋白利用抗明胶酶单链抗体 scFv 的结合特异性将强化的力达霉素靶向于抗原高表达

的肿瘤组织部位,发挥对肿瘤细胞的强杀伤活性,具有强烈的抑制血管生成作用,在体内试验有显著的治疗效果,展示了良好的应用前景。

1. 力达霉素辅基蛋白 LDP/抗明胶酶单链抗体 scFv 基因的克隆构建: 重组质粒 pPIC-9kFv1027 和 pIJ1027GRGDS 分别含有 scFv 基因和 LDP 基因,由本实验室保存。pGEM-T vector 为美国 Promega 公司产品,大肠杆菌菌种 E. coli DH5a 系本实验室保存。PCR 引物由赛百盛公司合成,分别引入相应的酶切位点。

scFv 5' 端引物 (PH1): 5' CGCATATG CAGGTGAAGCTGCAGCAGTCT 3'

Nde I V_H

scFv 3' 端引物 (PL2): 5' CGGAATTC TGAACCGCCTCCACC ACGTTTGATTTCAG 3'

EcoR I

spacer

V_L

LDP 5' 端引物 (PLD1): 5' CGGAATTC GCGCCCGCCTTCTCCGTCAGTCCC 3'

EcoR I LDP

LDP 3' 端引物 (PLD2): 5' CCGCTCGAG TCAGCCGAAGGTCAGAGCCACGTG 3'

Xho I LDP

以重组质粒 pPIC-9kFv1027 为模板, PH1 为 5' 引物, PL2 为 3' 引物进行 PCR 扩增, 获得 C 端带有一段小肽 spacer 的单链抗体 scFv 基因片段; 同时以重组质粒 pIJ1027GRGDS 为模板, PLD1 为 5' 引物, PLD2 为 3' 引物进行 PCR 扩增, 获得 LDP 基因片段。PCR 反应体系为 94℃ 预变性 2 分钟, 然后进行 25 轮 PCR 循环: 94℃ 变性 1 分钟, 55℃ (scFv 基因的扩增) 或 58℃ (LDP 基因的扩增) 退火 1 分钟, 72℃ 延伸 1 分钟, 最后一个循环后在 72℃ 保温 10 分钟。

两种 PCR 产物利用 DNA 片段玻璃奶回收试剂盒 (BioDev 公司产品) 纯化回收后, 依 Promage 公司试剂盒提供方法与 Promage 公司的 pGEM-T 载体相连, 转化大肠杆菌 DH5 α, 筛选出重组 T 载体 pGEM-T-Fv 和 pGEM-T-LDP 进行酶切鉴定 (图 1), 分别由上海生工生物公司进行序列测定, scFv 基因全长 738bp, 编码 246 个氨基酸, LDP 基因全长 345bp, 编码 115 个氨基酸, 二者之间的柔性肽基因 15bp, 编码 5 个氨基酸, 编码羧基端的组胺酸六聚体尾的基因为 18bp, 编码 6 个氨基酸以及终止密码子 3bp, 基因总数 1119bp, 编码 372 个氨基酸。

2. 融合蛋白大肠杆菌重组表达质粒 pEFL 的构建: 本发明选用的大肠杆菌表

达质粒 pET30a (+) (Invitrogen 公司产品) 为本实验室保存。将重组克隆质粒 pGEM-T-Fv 用 Nde I 和 EcoR I、重组克隆质粒 pGEM-T-LDP 用 EcoR I 和 Xho I 进行双酶切获得酶切后片段, 经琼脂糖凝胶电泳分离回收。将上述两个片段克隆至经 Nde I 和 Xho I 酶切的表达载体 pET30a (+) 内, 转化入宿主菌 BL21 (DE3) star™ (Invitrogen 公司产品) 的感受态细胞, 筛选获得转化子并提取重组质粒。将获得的重组表达质粒进行酶切鉴定, 表明其中含有正确的插入片段 (图 2)。应用两条 T7 通用引物进行测序, 结果表明该融合基因 Fv-LDP 序列与预期的序列完全一致。本发明使用的表达质粒 pET30a (+), 在其多克隆位点的 3' 端融合有一段编码组氨酸六聚体尾 (His₆-Tag) 的基因序列, 经翻译表达后, His₆-Tag 便于融合蛋白的表达鉴定与分离纯化。

3. 融合蛋白 Fv-LDP 在大肠杆菌 BL21 (DE3) star™ 中的诱导表达: 从 LB 平板上挑取上述转化子接种到含有 50 μg/ml 卡那霉素的 LB 培养基中, 37℃ 振荡过夜; 次日按 1:50 转种, 37℃ 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.9, 向培养物中加入终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG (中文含义), 诱导培养 4-6 小时, 取 1ml 培养液, 12000 rpm 离心 1 分钟收集菌体, 去上清, 菌体细胞重悬在 300 μl PBS 中, 超声破碎菌体后, 12000 rpm 离心 10 分钟, 分别收集上清, 沉淀重悬在 300 μl PBS 中; 以 12% SDS-PAGE 电泳分析外源蛋白的表达情况, 融合蛋白以不可溶的包涵体形式得到表达 (图 3)。凝胶成像系统定量分析显示, 以最佳条件诱导表达获得的融合蛋白的表达量占转化子菌株总蛋白的 30% 以上, 最终挑选出最优表达融合蛋白的转化菌株, 其中含有能够表达融合蛋白 Fv-LDP 的 pEFL 质粒, 命名为 CAMS/FLDFP, 于 2003 年 7 月 ×× 日送交位于北京的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏, 保藏编号: CGMCC No. 0960。

以 Western Blot 检测分析, 12% SDS-PAGE 电泳后在 Bio-Rad 电转移槽中进行半干电转, 电转移条件为: 恒电流 0.65 mA/cm², 时间约 1.5-2 小时。电转结束后的 PVDF 膜分别与含有封闭液稀释的一抗 F9 或抗 His-Tag 单抗孵育, 以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体为二抗, 进行显色分析, 转化菌株 CAMS/FLDFP 成功表达了融合蛋白 Fv-LDP (图 4)。

4. 融合蛋白 Fv-LDP 的亲亲和层析纯化及分离制备: 采用 His•bind 纯化试剂盒 (Novagen 公司产品) 于变性条件下纯化蛋白样品。经预处理亲和柱后, 以 3

体积含 6 M 尿素的 1xBinding Buffer 平衡层析柱，再以变性蛋白样品上柱后，依次以 10 体积的含尿素 1Xbinding buffer (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM 咪唑, 6 M Urea, pH 7.9), 6 体积含尿素 1Xwashing buffer (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 60 mM 咪唑, 6 M Urea, pH 7.9) 洗涤层析柱，最后以 6 体积含 6M 尿素的 1xElute Buffer 进行洗脱，收集洗脱组份获得纯化后的融合蛋白 (图 5)。继而行透析复性，蛋白样品依次对复性缓冲液 I (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 3 M Urea, 5 mM EDTA, pH 8.0)、复性缓冲液 II (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 M Urea, 5 mM EDTA, 0.2 mM GSSG, 2 mM GSH, 0.4 M L-Arg, pH 8.0) 和复性缓冲液 III (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0) 进行透析，再以 PBS (pH 7.4) 透析、浓缩，经 PD-10 (Sephadex G25 商业柱) 脱盐、冷冻干燥，于 -70℃ 保存备用。

5. 强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 的制备分离：取 AE 高含量的 LDM 冻干品 10 mg，加 5 ml 冷甲醇振摇 5 min，-20℃ 放置 1h，中间振摇 1 次；在 0℃，12000 r/min 离心 20 min，上清液富含 AE，沉降物为肽链，重复提取 2 次。自然蒸发浓缩甲醇溶液，实验需低温（具体温度？）、避光进行。取一定体积和浓度的 Fv-LDP 溶于 0.01 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中，加 5 倍分子量的 AE 甲醇溶液（体积比为 1:50），混合振摇，室温放置 12 小时，将混合液以 PD-10 柱（商业化的 Sephadex G-25 柱，Pharmacia 产品）层析分离，经 A280nm 紫外监测后弃过量未反应的 AE，收集强化融合蛋白 Fv-LDP-AE (图 6)。

6. 融合蛋白 Fv-LDP 的免疫学活性：用间接 ELISA 检测，以 10 µg/ml 明胶酶（溶于 PBS 中）100 µl/孔包被 96 孔酶标板，置 4℃ 过夜作为抗原；以 10⁴/孔的密度将 HT-1080 细胞或 HT-29 细胞接种于 96 孔板中 37℃ 培养过夜；弃上清后，以 0.25% 戊二醛固定细胞，作为细胞抗原；以 100 µl 10% 脱脂奶粉进行封闭，每孔加入 100 µl 不同浓度梯度的融合蛋白 Fv-LDP，37℃ 孵育后以 100 µl 1 µg/ml 的抗 LDM 单抗 F9 为一抗，HPR 标记的羊抗鼠 IgG 抗体为二抗，每孔加入 100 µl OPD 底物反应液进行显色反应，酶标仪测定 490 nm 处吸光值。结果显示，融合蛋白与明胶酶、HT-29 和 HT-1080 肿瘤细胞的免疫反应性均为阳性 (图 7)。

7. 融合蛋白 Fv-LDP 与人体肿瘤组织的免疫学活性：采用博士德免疫组化试剂盒提供的链霉卵白素-生物素-酶联复合物 (SABC) 染色方法，滴加正常山羊

血清封闭液，室温孵育 20 分钟；吸取多余液体，不洗，直接滴加适当稀释的一抗融合蛋白 Fv-LDP，室温孵育；再依次滴加适当稀释的二抗 F9 单抗和生物素化的羊抗鼠 IgG 抗体，最后滴加试剂 SABC，以 DAB 试剂盒室温显色，常规苏木素轻度复染，脱水透明封片。观察染色结果（图 8）发现，Fv-LDP 可与人体结肠腺癌组织中的 MMP-2/MMP-9 发生免疫反应而呈阳性染色，其阳性染色颗粒位于结肠腺癌腺细胞样肿瘤细胞的胞浆内。

8. 融合蛋白 Fv-LDP 抑制肿瘤细胞分泌明胶酶的活性：取对数生长长期的人纤维肉瘤 HT-1080 细胞，按 1×10^5 /ml/孔加于 24 孔培养板， 37°C ，5% CO_2 培养 24 小时；弃培养液，加入 200 μl 无血清 RPMI 1640（中文含义）培养液，继续培养 2 小时后，加入 100 μl 的融合蛋白 Fv-LDP 于 37°C 孵育 24 小时后，吸取培养液， $500 \times g$ 离心 5 分钟，取少量细胞上清以 Bradford 法（中文含义）测定蛋白含量，绘制标准曲线及测定样品的浓度，以相应体积取上清进行非变性 PAGE 电泳。电泳完毕后将凝胶放入 100 ml 2.5% Triton X-100 溶液中漂洗 30 分钟，重复一次，蒸馏水漂洗 2 次，加入 100 ml 明胶酶缓冲液（50 mM Tris-HCl, pH7.5, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 1 μM ZnCl_2 ）， 37°C 孵育 16 小时；考马斯亮蓝 R250 染色脱色后观察负染的明胶水解条带。结果表明，融合蛋白 Fv-LDP 明显地抑制肿瘤细胞 HT-1080 分泌明胶酶的活性（图 9）。

9. 强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 抑制血管生成作用：以鸡胚尿囊膜法检测其对血管生成的抑制作用。将新鲜受精的白皮来航鸡种蛋气室端朝上， 37°C ，60% 湿度的恒温室中孵育 7 天后再消毒鸡蛋外壳，以针刺入气室，将 2 ml 空气吸入气室内以使鸡胚尿囊膜与血管卵膜分离，同时以砂轮磨壳小心剥去外壳形成一个 $2 \times 2 \text{ cm}^2$ 小窗，立即用透明胶带封好，继续于 37°C ，60% 湿度的恒温室中孵育 24h。至孵育第九天小心吸取 10 μl 的 bFGF（中文含义）滴加于预先准备好的二甲基纤维素载体盘中，同时加入不同浓度的强化融合蛋白 Fv-LDP-AE，将载体盘置于大血管及胚心远端，封窗，继续于 37°C ，5% CO_2 细胞培养箱中孵育 48 h 后观察，结果显示，Fv-LDP-AE 能明显抑制 bFGF 刺激鸡胚尿囊膜新生血管的生成（图 10）。

10. 强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 对肿瘤细胞的细胞毒作用：用克隆形成法测定，取对数生长长期的 HT-29 细胞加入 96 孔培养板，每孔 50 个细胞 /0.2 ml，培养 24 h。10 倍稀释各药物和组装偶联物，每浓度设 3 个平行孔，每孔 50 μl ，

37℃温育 1 h, 无血清 PRMI 1640 培养液洗 2 次, 加入新鲜培养液, 继续培养 7 天, 第 7 天于镜下计数细胞集落。结果表明, Fv-LDP-AE 的对肿瘤细胞有强烈的杀伤作用, 半数克隆抑制浓度 IC_{50} 为 $1.65 \times 10^{-16} M$ (图 11)。

11. 强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 的动物实验治疗方案: 根据剂量初筛结果设计动物实验治疗的给药方式和剂量。领取体重为 18-22 g 的昆明小鼠 60 只, 随机分为 6 组, 每组 10 只。实验第 0 天, 取小鼠肝癌 H22 腹水, 以生理盐水稀释成细胞数为 $1.5 \times 10^6 / ml$, 按 0.2 ml/只接种于昆明小鼠腋窝皮下。小鼠皮下接种 H22 肿瘤 24 h 后, 分别于实验第 1 和第 10 天给予生理盐水、Fv-LDP、游离 LDM 以及三个剂量的 Fv-LDP-AE, 尾静脉注射给药 2 次。实验期间每 3-4 天测定肿瘤大小, 以公式 $1/2ab^2$ (a: 肿瘤长径, b: 肿瘤短径) 计算肿瘤体积和抑瘤率。实验第 21 天结果表明, 强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 体内有显著的疗效, 于 0.8、1.6、3.2 mg/kg 的剂量, 可明显抑制肝癌 H22 皮下瘤的生长, 如下表所示:

Fv-LDP-AE 对小鼠移植性肝癌 H22 的生长抑制作用

组别	剂量 (mg/kg)	小鼠数量 实验开始/结束	体重变 化 (g)	肿瘤体积 (cm^3) $\bar{x} \pm SD$	抑制率 (%)
空白对照	-	10/10	22	14.6 \pm 4.3	
LDM	0.05	10/10	19.5	4.3 \pm 2.6	70.3*
Fv-LDP	2.4	10/10	15.7	11.9 \pm 5.8	18.7
Fv-LDP-AE	3.2	10/10	4.5	0.6 \pm 0.3	95.9* [▲]
Fv-LDP-AE	1.6	10/10	8.7	1.8 \pm 1.2	87.8* [▲]
Fv-LDP-AE	0.8	10/10	9.7	2.1 \pm 1.1	85.7* [▲]

* 与空白对照组相比, $P < 0.01$, [▲] 与 LDM 组相比, $P < 0.05$ 。

从肿瘤生长曲线 (图 12) 可见, Fv-LDP-AE 在 3.2 mg/kg 剂量时疗效尤其显著, 其第 14、17、21 天的抑制率分别为 92.2%、95.2%、95.9%。治疗期间, 动物的体重无明显变化, 一般状况良好, 表明动物可耐受所用剂量。

发明效果:

本发明的优点与积极效果在于, 应用基因工程技术和分子强化相结合的技术路线制备获得的强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 是一种新型高效小型化免疫导向药物,

以基质金属蛋白酶 MMP-2/MMP-9 为靶点的 scFv 片段与力达霉素构成的强化融合蛋白 Fv-LDP-AE, 基本保留了完整单抗的抗原结合活性, 能抑制肿瘤细胞对明胶酶的分泌活性, 同时显示对肿瘤细胞的强杀伤活性以及抑制血管生成作用, 在动物体内实验治疗有显著疗效, 展示其具有良好的应用前景。

附图说明:

图 1: scFv 和 LDP 基因的 PCR 扩增及重组克隆载体的限制性内切酶分析

其中: 1- DNA 分子量标准 2- scFv 的 PCR 产物
3- LDP 的 PCR 产物 4- 重组质粒 pGEM-T-scFv/Nde I + EcoR I
5- 重组质粒 pGEM-T-LDP/EcoR I + Xho I

图 2: 转化菌株 BL21 (DE3) star™ / pEFL 中重组表达质粒 pEFL 的限制性内切酶分析

其中: 1- DNA 分子量标准 2- 质粒 pET-30a(+)
3- 重组质粒 ppEFL 4- pET-30a(+)/Nde I + EcoR I
5- pEFL/Nde I + EcoR I 6- pET-30a(+)/EcoR I + Xho I
7- pEFL/EcoR I + Xho I 8- pET-30a(+)/Nde I + Xho I
9- pEFL/Nde I + Xho I

图 3: 融合蛋白 Fv-LDP 表达产物的 SDS-PAGE 分析

其中: 1- 蛋白分子量标准
2- BL21 (DE3) star™ / pET-30a(+) IPTG 诱导前全菌蛋白
3- BL21 (DE3) star™ / pET-30a(+) IPTG 诱导后全菌蛋白
4- 转化菌株 CAMS/FLDFP 经 IPTG 诱导前全菌蛋白
5- 转化菌株 CAMS/FLDFP 经 IPTG 诱导后全菌蛋白
6- 转化菌株 CAMS/FLDFP 经 IPTG 诱导后菌体上清
7- 转化菌株 CAMS/FLDFP 经 IPTG 诱导后菌体包涵体沉淀

图 4: 融合蛋白 Fv-LDP 的 Western-blot 分析

其中: A: 以抗力达霉素辅基蛋白单抗 F9 为一抗

B: 以抗组氨酸标记尾单抗为一抗

1- BL21 (DE3) star™ / pET-30a(+) IPTG 诱导前全菌蛋白
2- BL21 (DE3) star™ / pET-30a(+) IPTG 诱导后全菌蛋白

- 3- 重组菌株 CAMS/FLDFP 经 IPTG 诱导前全菌蛋白
- 4- 重组菌株 CAMS/FLDFP 经 IPTG 诱导后全菌蛋白
- 5- 重组菌株 CAMS/FLDFP 经 IPTG 诱导后菌体包涵体沉淀
- 6- 重组菌株 CAMS/FLDFP 经 IPTG 诱导后菌体上清

图 5: 融合蛋白 Fv-LDP 经金属整合层析纯化的 SDS-PAGE 分析

- 其中:
- 1- 蛋白分子量标准
 - 2、3- 未上亲和层析柱前样品
 - 4- 结合缓冲液洗柱后收集的液体
 - 5- 以 20mM 咪唑漂洗缓冲液洗柱后收集的液体
 - 6-10- 以 1M 咪唑洗脱缓冲液洗柱后先后收集的蛋白组分

图 6: 强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 的分离纯化

- 其中:
- 峰 1- 纯化的强化融合蛋白 Fv-LDP-AE
 - 峰 2- 未反应的过量的 AE

图 7: ELISA 分析融合蛋白 Fv-LDP 与明胶酶和不同肿瘤细胞的免疫反应性

- 其中:
- ▲ 明胶酶
 - HT-29 细胞
 - ◆ HT-1080 细胞

图 8: 免疫组化染色分析融合蛋白 Fv-LDP 与人体结肠癌组织的免疫学活性

- 其中:
- A: FvLDP 在人结肠癌组织中的免疫组化染色
 - B: 阴性对照, PBS 替代 FvLDP 为一抗
- 放大倍数为 200x, 图中标尺为 20 μm 。

图 9: 融合蛋白 Fv-LDP 对 HT-1080 细胞的明胶酶谱分析

- 其中:
- 1- PBS
 - 2- BL21 (DE3) /pET-30a(+) IPTG 诱导后全菌蛋白
 - 3- 完整单抗 3G11 (6 μM)
 - 4- 融合蛋白 Fv-LDP (30 μM)

图 10: 强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 对 bFGF 刺激鸡胚尿囊膜血管生成的抑制作用

- 其中:
- A: 仅 PBS 处理后的鸡胚尿囊膜血管
 - B: 以 bFGF 为刺激物, PBS 处理后的鸡胚尿囊膜血管

C: 以 bFGF 为刺激物, LDM ($0.1 \mu\text{g}/\text{鸡胚}$) 处理后的鸡胚尿囊膜血管
 D: 以 bFGF 为刺激物, Fv-LDP-AE ($0.4 \mu\text{g}/\text{鸡胚}$) 处理后的鸡胚尿囊

膜血管

图 11: 强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 对肿瘤细胞 HT-29 的杀伤活性

其中: ◆ Fv-LDP-AE

■ LDM

图 12: 强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 对小鼠体内肝癌 H22 生长的抑制作用

其中: ◆ 对照

▲ FvLDP 组

■ LDM 组

△ Fv-LDP-AE3.2 组

◇ Fv-LDP-AE1.6 组

□ Fv-LDP-AE0.8 组

序 列 表

<110>中国医学科学院医药生物技术研究所

<120>具有抑制血管生成及抗肿瘤作用的强化融合蛋白 Fv-LDP-AE

<140>

<141>

<160>1

<170>

<210>1

<211>1119

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222>

<223>

<400>1

atgcaggtga agctgcagca gtctggaact gaagtggtaa agcctggggc ttcagtgaag	60
ttgtcctgca aggcttcttg ctacatcttc acaagttatg atatagactg ggtgaggcag	120
acgcctgaac agggacttga gtggattgga tggatttttc ctggagaggg gagtactgaa	180
tacaatgaga agttcaaggg cagggccaca ctgagtgtag acaagtcctc cagcacagcc	240
tatatggagc tcactaggct gacatctgag gactctgctg tctatttctg tgctagaggg	300
gactactata ggcgctactt tgacttgtgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca	360
ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggcggtggcg gatcggacat cgagctcact	420
cagtctccag cttcttttggc tgtgtctcta gggcagaggg ccaccatata ctgcagagcc	480
agtgaaagtg ttgatactta tggcgatact tttatgtact ggtaccagca gaaaccagga	540
cagccaccca aactcctcat ctatcttgca accaacctag gatctggggc ccctgccagg	600
ttcagtggca gtgggtctag gacaaacttc accctcacca ttgatcctgt ggaggctgat	660
gatgctgcaa cctattactg tcagcaaaat aatgaggatc cgtacacgtt cggagggggc	720
accaagctgg aaatcaaacg tgggtggaggc ggttcaccat gggcgccgcg cttctccgtc	780
agtcccgctt cgggtctgag tgacggacag agcgtgtcgg tgtcggtcag cggtgccgcc	840
gccggcgaga cctactacat cgcccagtg cgtccggtcg gtggccagga cgcgtgcaac	900
ccggcgaccg cgacgtcctt caccacggac gcgtccggag cggcgtcgtt cagcttcgtc	960
gtgcgcaagt cgtacacggg ctccacgccc gaaggcacgc cggtcggcag cgtcgactgc	1020
gccacggccg cctgtaacct cggcgccggc aactccgggc tcgacctcgg ccacgtggct	1080
ctgaccttcg gcctcgagca ccaccaccac caccactga*	1119

03-07-22

说明书附图

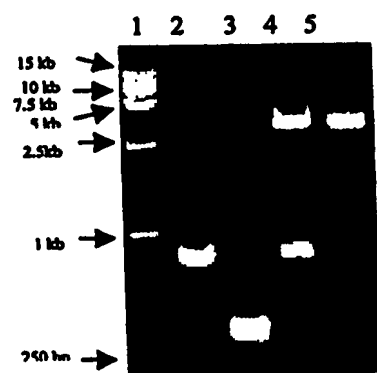


图 1

03-07-22

48

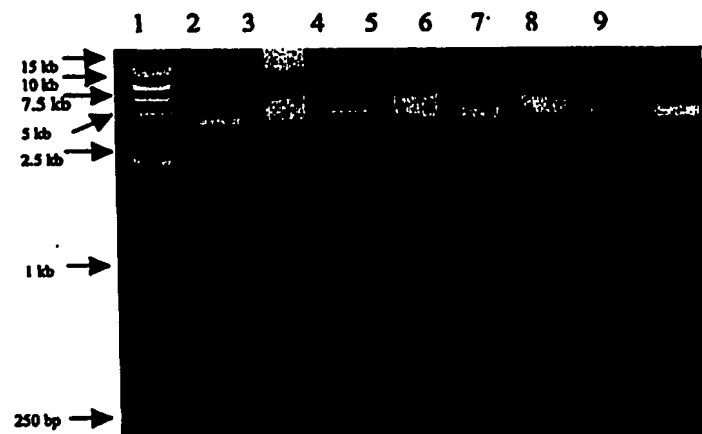


图 2

03.07.22

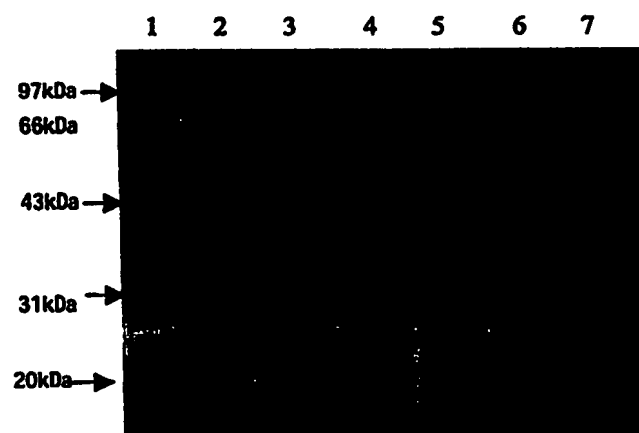


Fig 3

03.07.22

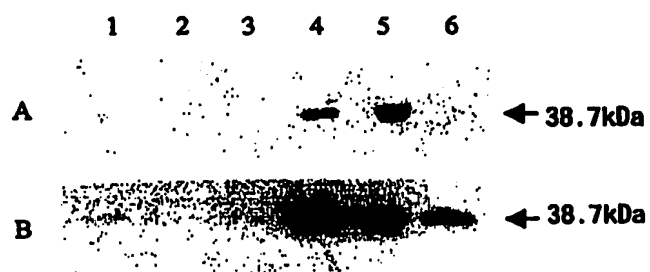


图 4

03-07-22

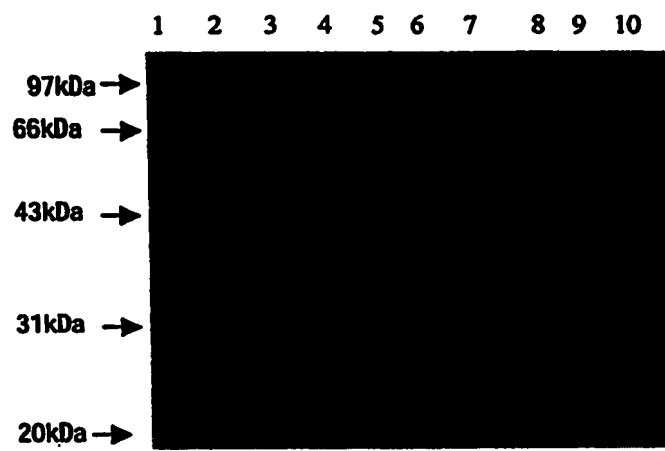


图 5

03.07.22

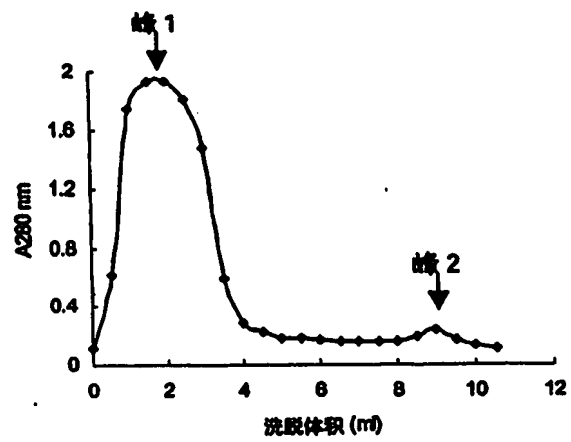


图 6

03-07-22

v

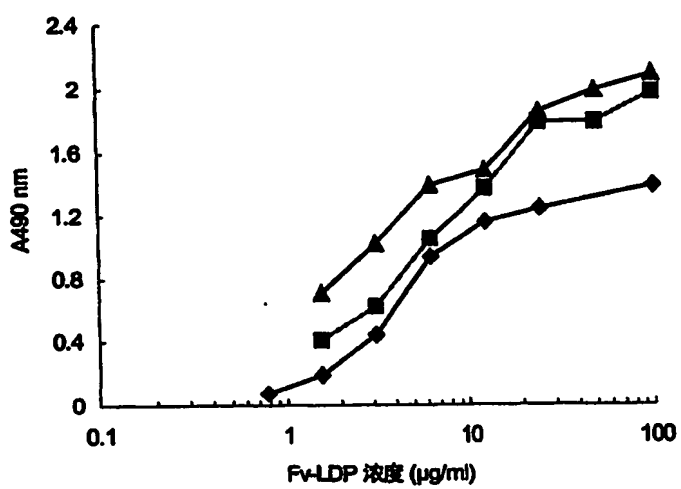


图 7

03-07-22

251



图 8

03.07.22

1

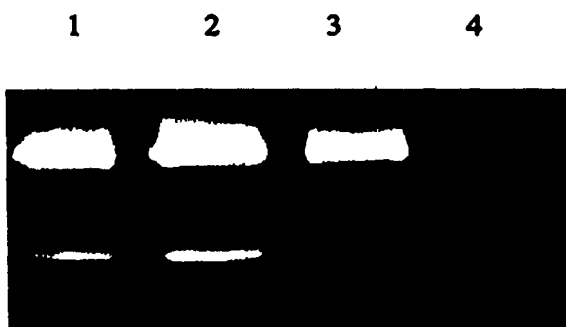


图 9

03.07.22

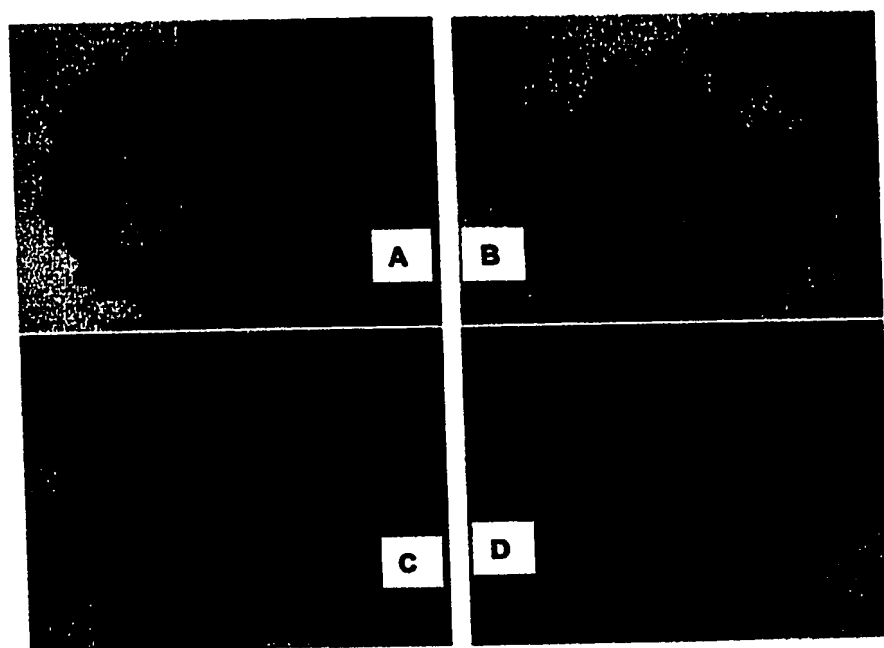


图 10

03.07.22

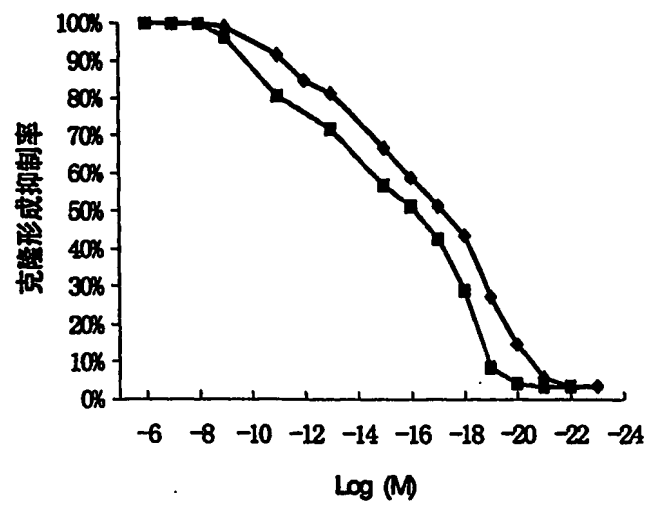


图 11

03.07.22

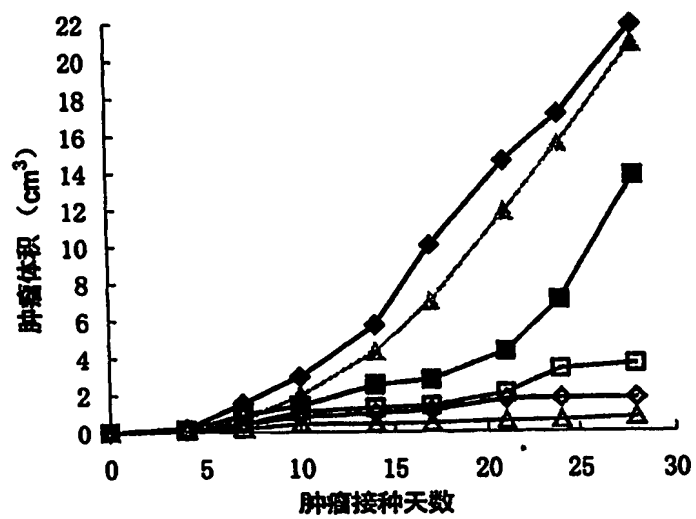


图 12

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.